



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 16 867 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
C 12 M 1/40
C 12 Q 1/68

②1 Aktenzeichen: 199 16 867.9
②2 Anmeldetag: 14. 4. 1999
④3 Offenlegungstag: 19. 10. 2000

⑦1 Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung eV, 80636 München, DE;
Bredehorst, Reinhard, Prof. Dr., 20255 Hamburg, DE

⑦3 Vertreter:
Leonhard Olgemöller Fricke, 80331 München

⑦2 Erfinder:
Bredehorst, Reinhard, 20255 Hamburg, DE;
Hintsche, Reiner, 13127 Berlin, DE; Seitz, Rene,
25524 Itzehoe, DE; Gumbrecht, Walter, 91074
Herzogenaurach, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Anordnung und Verfahren zur Herstellung planarer Arrays mit immobilisierten Molekülen

⑤7 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren werden auf planaren Substraten oder planaren Sensorelementen auf definierten und separierten Flächen unterschiedliche Biomoleküle durch chemische Reaktionen auf der Oberfläche als Arrays erzeugt. Erfindungsgemäß werden zur Aufnahme unterschiedlicher Reaktionslösungen dreidimensionale Mikrokompartmente oder Mikrokapillarreaktoren mit Öffnungen über den Arraypositionen auf dem Substrat befestigt oder mittels Masken- und Ätztechniken erzeugt. Die Mikrokompartmente werden als topfartige einzelne Reaktoren oder als Mikrokapillarreaktoren verbunden durch Kanäle, die die Kapillarkraft nutzen, ausgebildet. Sie bestehen aus polymeren oder mineralischen oder metallischen Materialien. Aus Lösungen, die in die Kompartimente eingebracht werden, werden durch chemische Bindung unterschiedliche Moleküle auf dem Boden der Kompartimente bzw. Mikrokapillarreaktoren immobilisiert. Nach erfolgter Immobilisierung der Molekülarrays können die Mikrokompartmente mechanisch oder chemisch wieder entfernt werden. Dadurch werden störende mechanische Barrieren bei fluidischen Prozessen vermieden. Als Hilfsmittel zur Beschickung oder Entleerung der Mikrokapillarreaktoren mit Flüssigkeiten ist ein Stempel beschrieben.

DE 199 16 867 A 1

DE 199 16 867 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft planare Substrate oder planare Sensorelemente, auf denen flächig abgegrenzt verschiedene Biomoleküle als sogenannte Arrays angeordnet werden. Diese Anordnung findet als Teil von Meßeinrichtungen bevorzugt in der chemischen Analytik, in der Biotechnologie und in der industriellen Prozeßkontrolle Verwendung. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen des vorgenannten Arrays sowie die Anwendung derselben.

Zur Immobilisierung und Lokalisierung verschiedener Arten chemischer Spezies in kleinen, lokalen Arealen sind seit langem Mikroreaktoren, auch Mikrokompartimente oder Mikrokavitäten bekannt [Micro Total Analytical Systems; Eds. von den Berg, A. and P. Bergveld, Kluwer Academic Publishers, London 1995; J. W. Parce, et al., Science 246(1989)243; P. Beyer Hietpas und Ewing, A. G. J. Liq. Chromatogr., 18(1995)3557; M. Jansson et al., Chromatogr. 626(1992)310; L. A. Holland, und Jorgenson, J. W., Anal. Chem. 67(1995)3275; C. D. T. Bratten et al., Anal. Chem. 69(1997)253], die in Silizium und Glas mit Standardverfahren der Mikrosystemtechnik erzeugt werden [G. T. A. Kovacs et al., Anal. Chem. 68(1996)407A; H. Mensinger et al., in Micro Total Analytical Systems; Eds., von den Berg, A. and P. Bergveld Kluwer Academic Publishers, London 1995, S 237; L. J. Kricka und Wilding, P. In Handbook of Clinical Automation, Robotics, and Optimisation, Rost, G. J.] als geätzte Strukturen in Si- oder Glas-Mikrosystemtechnologie sowie in Kunststoffen über Prägeverfahren. Zitat 11: Emmer, A.; Roeraade, J.; Lindberg, U.; Hök, B. J. Zitat 12: Holland, L. A.; Jorgenson, J. W. Anal. Chem. 1995, 67, 3275 Bratten, C. D. T.; Cobbold, P. H.: Copper, J. M. Anal. Chem. 1997, 69, 253] in Silizium und Glas mit Standard-Mikrosystemtechniken erzeugt werden [Zitat 14 16]. Biebuyck und Whitesides, Langmuir 1994, 10, 2790 beschreiben solche Anordnungen von Mikrokavitäten zur Aufnahme von Tropfen kondensierter Flüssigkeiten.

R. A. Clark et al. Anal. Chem. 69(1997)259 beschreiben eine fotolithografische Technik zur Erzeugung kleinster separierter Mikrokavitäten in Polystyrol. Auch die geätzten Enden in polymere eingebetteter Faserbündel wurden als Mikrokavitäten genutzt [K. S. Bronk und Walt, D. R., Anal. Chem. 66(1994)3519].

Das Auf- bzw. Einbringen verschiedener Lösungen von Molekülen in Mikrokavitäten läßt sich gut mit Mikropipetten ausführen [M. Gratzl und Yi, C. Anal. Chem. 65 (1993) 2085; C. Yi und Gratzl, M. Anal. Chem. 66(1994)1976; C. Yi et al., Anal. Chem. 68(1996)1580 sowie R. A. Clark et al., Anal. Chem. 69(1997)259].

Im US Patent 5605662 ist die Bildung mikrostrukturierter Areale von gelbedeckten Elektroden zur Aufnahme verschiedener Moleküle, wie Nukleotide beschrieben und die Beschickung mit Flüssigkeiten aufgezeigt.

Charakteristische Nachteile der vorstehend beschriebenen dauerhaften Mikrokavitäten, bzw. Kompartimentstrukturen zur Herstellung von Bioarrays sind die bestehenden mechanischen Hindernisse auf der Oberfläche der Substrate. Notwendige gleichmäßige Reagentienzuführung bzw. Spülvorgänge können in Mikrokavitäten schlecht realisiert werden, da hohe Kapillarkräfte den Flüssigkeitsaustausch behindern können und so bei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten unerwünschte Verunreinigungen bewirken. Darüber hinaus wird die Befüllung der Mikrokavitäten besonders bei Si- und Glasoberflächen durch Luftblasenbildung erschwert. Technologischen Schwierigkeiten und Kostenachteile entstehen insbesondere, wenn es notwendig ist, chemische oder physikalische Sensorelemente in oder unter die Mikrokavitäten individuell zu platzieren. Ein weiterer

Nachteil der dauerhaft volumenkompartimentierten Mikroarrays ist die Schwierigkeit, Analyte homogen und gleichmäßig in alle Mikrokompartimente zu verteilen und gegebenenfalls wieder zu entfernen.

In Science 264(1994)696 wurde von R. Shighvi et. al. ein elastomerer Polysiloxan-Stempel zur Abformung mittels fotolithografischer Techniken beschrieben, mit dem durch Drucken und Abstraktionsverfahren mittels thiolderivatisierter Fettsäuren molekülstrukturierte Arrays hergestellt werden können. Durch das Abstempeln dieses Stempels auf Goldsubstraten können sich selbstorganisierende monomolekulare Schichten entsprechend der Form des Stempels ausbilden, die als Barriere für aufwachsende Zellen nutzbar waren. Eine Weiterentwicklung dieser Technologie, auch Microcontact-printing genannt, wird in Nanotechnology 7(1996)452 beschrieben. Dabei können Goldflächen durch Stempel mit Monomoleküllagen beschichtet und als Schutz vor chemischem Ätzen genutzt werden, um zwischen den Stempelbereichen liegende Substratgebiete bis in den nm-Bereich zu strukturieren. Zusätzlich können danach von Gold- und Metall befreite Flächen im Silizium oder Glas chemisch geätzt werden, so daß mikromechanisch erzeugte Vertiefungen oder Mikropompartimente mit Geometrien zwischen wenigen nm und einigen µm gefertigt werden können. Eine weitere Variante dieses Mikrokontaktprintings wird in Kombination mit Trockenätzverfahren beschrieben [Nanotechnology 7(1996)447].

Von makroskopischen Aufputzen ist das Aufsetzen miniaturisierter Ringe auf Chipoberflächen abgeleitet, auf die vorher entsprechende Moleküle durch Tauchen aufgebracht wurden [531. Rose, J. Ass. Lab. Autom. 3, 3(1998) 53]. Die Kontaminationsgefahr ist bei dieser Methode erheblich.

Das sogenannte Mikrokontaktdrucken, d. h. das Übertragen von Molekülen mittels Mikrostampel wurde von A. Rumar und G. M. Whitesides [Appl. Phys. Lett. 63(1993)2002] beschrieben.

Nachteile der Stempeltechniken sind mangelnde Kantenpräzision und Inhomogenitäten bei der Flächenverteilung der Moleküle insbesondere mit zunehmender Stempelfläche.

R. M. Wadkins et al., Biosensors & Bioelectronics 13(1998)407 stellten temporär 0,2 mm hohe Mikrokompartimente durch Photostrukturierung eines flüssigen polymeren Klebers und einer komplizierten manuellen Wattlebausch/Aceton-Prozedur her. Mit konventionellen Immobilisierungsverfahren wurden dann verschiedene Antikörper an den Boden der Kompartimente gebunden und danach die Kompartimente durch Ablösen mit Protein-Salzlösung beseitigt.

Obwohl Wadkins et al. eine Lösung für das anschließende Beseitigen der Kammern anbieten, erlauben hier sowohl die verwendeten chemischen Komponenten als auch die beschriebenen Verfahrensschritte keine technologische Kompatibilität, d. h. Massenfertigung mit industriellen Standardmethoden z. B. auf Wafern.

Lokalisierte Substanzarrays können auch durch die Verwendung einer Mikrovernebelungstechnik erzeugt werden [M. Gratzl und Yi, C. Anal. Chem. 65(1993)2085; C. Yi und Gratzl, M. Anal. Chem. 66(1994)1976; C. Yi et al., Anal. Chem. 68(1996)1580]. Die lokalisierte Aufbringung kleinster mikroskopischer Tropfen von Flüssigkeiten mit verschiedenen Substanzen ist nach Biebuyck und Whitesides [Langmuir 10(1994)2790] ebenso auf strukturierte, sogenannte "self assembled monolayers" möglich [R. A. Clark et al., Anal. Chem. 69(1997)259].

Auch die Befüllung mit Mikrotröpfchen nach Art der allgemein bekannten Tintenstrahl Drucktechniken ist üblich und wird häufig verwendet.

Zum Absetzen von sogenannten Mikrosots auf planare

Träger und Transducer beschreiben auch A. V. Lemmo et al. in Anal. Chem. 69(1997)543 analoge Tintenstrahltechnologie.

Das sogenannte Mikrokontaktdruck, d. h. das Übertragen von Molekülen mittels Mikrostempel wurde von A. Kumar und G. M. Whitesides [Appl. Phys. Lett. 63(1993)2002] beschrieben.

Für die Erzeugung von planaren Arrays mit unterschiedlichen immobilisierten Molekülen beschreiben Blanchard et al., Biosensors & Bioelectronics 11(1996)687 das Absetzen von Flüssigkeitstropfen mit Tintenstrahldrucktechnologie auf ca. 100 µm große Kreisflächen mit hydrophilen Oberflächeneigenschaften, die durch ca. 30 µm breite Bereiche mit hydrophoben Oberflächeneigenschaften getrennt sind. Durch die schlechtere Benetzbarkeit der hydrophoben Bereiche mit wässrigen Flüssigkeiten soll die Vermischung benachbarter Tropfen verhindert werden. Da hydrophile und hydrophobe Bereiche keine Höhenunterschiede aufweisen, bleibt die Gefahr mechanisch verursachter Kontamination besonders bei den angestrebten schnellen und automatisierten Verfahren der Beschickung bestehen und schränkt die Anwendbarkeit ein.

Bei den beschriebenen Verfahren zur Arrayerzeugung auf planaren Elementen mit den genannten Mikrospt., Nebel- oder Druckverfahren ist rasches Antrocknen der verwendeten Flüssigkeiten und Reaktionspartner notwendig, um eine Vermischung zu vermeiden. Probleme dieser Verfahren sind geometrische Unregelmäßigkeiten der Spots, Ausschluß von quantitativer Dosierung auf individuelle Positionen und Einschränkung der anwendbaren Kopplungsreaktionen in flüssiger Phase sowie die mögliche Verschleppung von Substanzen zwischen einzelnen Arraypositionen.

Ein weiteres Verfahren zum strukturierten Belegen von Oberflächen ist die fotochemisch induzierte Bindung von Molekülen oder Molekülketten an laseraktivierte Mikroflächen [A. C. Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91(1994),5022].

Eine weitere Methode zur selektiven Aufbringung organischer Haft- und Kopplungsschichten ist die Elektropolymerisation, beispielsweise für die Bindung von Ferrocenen auf Platinelektroden [G. N. Ramau et al. in Anal. Chem. 66(1994)994].

Eine neuere Methode zur Herstellung und zum Füllen von Mikrokavitäten in nm- und µm-Dimensionen ist die sog. "Dewetting"-Technik, die Kapillarkräfte zum Befüllen und das Abfließen der Flüssigkeit von der planaren Oberfläche nutzt [Whitesides et al., Anal. Chem. 70(1998)2280].

Durch perforierte Membranen, die auf Chipoberflächen aufgedruckt werden, sind an den offenen Stellen Immobilisierungsreaktionen an den Oberflächen in flüssiger Phase möglich [E. Ermantraut et al., Proc. of µTAS '98, Alberta, Can., 1998, p. 217]. Dieses Verfahren birgt Kontaminationsprobleme durch Kapillarkräfte zwischen Stempel und Arrayoberfläche, die Fehler bei Synthese- oder Immobilisierungsreaktionen hervorrufen können.

Die Bewertung der beschriebenen Verfahren zur Bioarraykonstruktion zeigt den Bedarf für eine Optimierung in Bezug auf technologisch kompatible und leistungsfähige Dosierverfahren ohne Kontaminationsprobleme in Verbindung mit einer günstigen Handhabung des fertiggestellten Arrays in Flüssigkeiten.

Die Modifizierung und Belegung anorganischer Oberflächen mit (polymeren) Biomolekülen wird in einer vielfältigen Art und Weise durchgeführt, wobei diese als Einzelschicht oder als Multilayer durch kovalente Anbindung, Adsorption, Einlagerung in Polymere oder als kristalline Filme aufgebracht werden. Zur chemischen Anbindung werden bifunktionelle Reagenzien verwendet, um die anorganische

Oberfläche des Basissubstrats mit chemischen Funktionen zu versehen, welche mit Biomolekülen reagieren können. Die nachfolgende Anbindung der Biomoleküle kann zum einen in direkter Weise oder auch zum anderen in indirekter Weise unter Verwendung weiterer homo- oder heterobifunktioneller Moleküle an die derivatisierte Oberfläche erfolgen [C. F. Mandenius et al., Methods in Enzymology 137(1988)388].

Weit verbreitet ist die Haftschiichterzeugung auf Oberflächen mit funktionalisierten Silanen als Monoschichten [C. M. Fischer et al., Europhysics Letters 28 (2) (1994) 129-134] über gasförmig oder in flüssiger Phase auf gebrachte quervernetzten Schichten [R. A. Williams et al., Biosensors & Bioelectronics 9(1994)159]. An diese Silanderivate, die Amino-, Thiol-, Aldehyd-, Hydroxyl-, Carboxyl- oder andere funktionelle Gruppen tragen können, werden meist mit Hilfe von Crosslinking-Techniken [H. G. Bäumert and H. Fasold, Methods in Enzymology, Vol. 172, p. 584] verschiedenste andere Verbindungen mit passenden reaktiven Gruppen kovalent gebunden. Auf diese Weise sind alle als Affinitätsbindende Fängermoleküle geeigneten bioaktiven Substanzen wie Oligonukleotide, Peptide, Haptene und andere auf den Elektrodenflächen zu immobilisieren.

Die aufgezeigten Verfahren stehen für Standardmethoden, die es erlauben, DNA, Oligonukleotide, Proteine und andere Moleküle auf Arraypositionen zu immobilisieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das es gestattet, auf planaren Substraten Bioarrays auszubilden, die technologisch kompatibel zur mikroelektronischen Chipherstellung hergestellt werden. Sie sollen im Waferverband die Immobilisierung von Biomolekülen erlauben, Kontaminationsprobleme minimieren und homogen zugänglich und unproblematisch für die fluidische Handhabung sein.

Erfindungsgemäß werden dazu Mikrokompartmente oder Mikrokappillarreaktoren verwendet, in denen Molekülimmobilisierungen in Massenfertigung realisiert werden können, die aber nach erfolgter Bindung von Molekülen bei Bedarf vom Träger oder Sensor wieder entfernt werden können. In einer besonderen Ausführung werden permanente Mikrokompartmente mit niedrigem Aspektverhältnis (Höhe/Durchmesser) aufgezeigt, die besondere Schutzvorrichtungen gegen Vermischungen aufweisen.

Preiswerte Herstellung durch Technologien der Halbleiterindustrie sowie komfortable Handhabung sind Merkmale der Erfindung.

Die Erzeugung separierter Mikrokompartmente auf Siliziumbauelementen ist dann hilfreich, wenn ein Sensorarray mit unterschiedlichen Molekülen z. B. DNS oder RNS bzw. ihren Bausteinen oder Proteinen oder Peptiden oder anderen Affinitätsbindenden Molekülen belegt werden sollen und dabei Flüssigkeitswechsel nötig sind. Im umgekehrten Fall sind die Kompartimente aber auch dann nötig, wenn in allen Mikrokompartmenten gleichartige Fängermolekülen gebunden werden, die danach mit unterschiedlichen Analyten getestet werden, die unterschiedlicher Stoffe oder zu detektierende Stoffgemische enthalten.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß auf planaren Substraten insbesondere aus Silizium, Glas oder Keramik, die gegebenenfalls elektrische oder optische Sensoren tragen, Mikrokompartmente erzeugt oder befestigt werden, die naßchemische Verfahren zur Erzeugung molekularer Arrays gestatten, ohne daß gegenseitige Kontaminationen entstehen. Die Erfindung realisiert die Mikrokompartmente vorzugsweise aus polymeren aber auch aus mineralischen oder metallischen Materialien. Die bestimmungsgemäßen Arrayflächen auf den Substraten oder Sensorelementen sind dabei durch Öffnungen oder Kanäle für

die zu applizierenden Flüssigkeiten und Moleküle zugänglich. In einer besonderen Ausführungsform werden jeweils 2 Mikrokompartiments durch einen Kanal zu einem sogenannten Mikrokapillarreaktor verbunden. Diese Mikrokapillarreaktoren sind besonders für komplexe Reaktionen Flüssigkeitswechsel gegebenenfalls mittel eines zusätzlichen stempelartigen Flüssigkeitsverteilers geeignet. Nach erfolgten Immobilisierungen unterschiedlicher Moleküle und gegebenenfalls Waschprozessen werden die Mikrokompartiments bzw. Mikrokapillarreaktoren entfernt. Besonders vorteilhaft ist dabei, daß auf diese Weise alle mechanischen Barrieren für den Flüssigkeitsaustausch zwischen den Arraypositionen beseitigt werden und für die Nutzung des Elementes wichtige weitere Spül-, Wasch- oder Detektionsprozesse beschleunigt und verbessert werden. Erfindungsgemäß ist die Möglichkeit gegeben, durch Prägung oder Fotolithographie im voraus strukturierte Materialien auf das Substrat oder das Sensorelement aufzubringen und durch Kleben oder Heißsiegeln oder Eigenadhäsion zu fixieren. Alternativ dazu können Folien oder dünne Platten im Ganzen aufgebracht werden. Durch konventionelle lithographische und Ätz-Verfahren werden sie dann an den gewünschten Arraypositionen geöffnet und vom kompartimentbildenden Material befreit.

Die vorliegende Erfindung ist besonders geeignet für Sensorelemente, bei denen Arrays verschiedene Moleküle, Molekülaggregate oder ganzer biologische Zellen auf die verschiedenen Positionen mit sensitiven optischen oder elektrischen Elementen lokalisiert aufgebracht werden müssen. Der Vorteil der Erfindung besteht insbesondere darin, daß das Verfahren gut mit der erprobten Silizium-Technologie sowie der automatisierten Flüssigkeitsverteilung mittels Dispenser- oder Tintenstrahlverfahren kombinierbar ist. Die erfindungsgemäße Beseitigung der Mikrokompartiments nach erfolgter Molekülarrayausbildung kann durch mechanisches Entfernen oder chemisches Ablösen so schonend erfolgen, daß empfindliche Biomolekülbeschichtungen nicht beeinflusst werden. Nach Entfernung der Polymere ist eine homogene Benetzung mit Flüssigkeiten oder anderen analytischen Medien ohne störende Oberflächenstrukturen möglich. Die gleichen Verfahren können auch benutzt werden, um in allen Mikrokompartiments oder Mikrokapillarreaktoren im Batchverfahren gleiche Molekülarten zu immobilisieren und sie danach zur analytischen Untersuchung mit unterschiedlichen Analyten bzw. Reaktionspartnern zu beschicken.

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt eine Aufsicht und Schnittbilder eines planaren Sensorarrays mit Mikrokompartiments und immobilisierten Molekülen;

Fig. 2 zeigt eine Aufsicht und Schnittbilder eines planaren Arrays mit Mikrokapillarreaktoren und immobilisierten Molekülen;

Fig. 3 zeigt eine Aufsicht und Schnittbilder eines planaren Sensorarrays mit strukturierten Oberflächen und immobilisierten Molekülen; und

Fig. 4 zeigt eine Aufsicht und Schnittbilder eines Stempels zur Handhabung von Flüssigkeiten auf einem planaren Array.

In **Fig. 1** ist die Erzeugung und Anwendung von Mikrokompartiments durch eine strukturierte Polymerbeschichtung auf einem Elektrodenarray in Siliziumtechnologie dargestellt. In **Fig. 1a** ist die Aufsicht auf ein Array mit 12 Sensorelektroden 2 auf einem isolierten Siliziumchip 1 dargestellt. Die elektrischen Chipkontakte 10 dienen als Anschlüsse, mit denen die Elektroden 2 elektrisch kontaktiert

werden. Die Leitungsbahnen verlaufen dabei nicht sichtbar unterhalb des Polymerfilms 3 und sind separat mit einem Isolator (nicht dargestellt) bedeckt. Mit den Flüssigkeitstropfen 6 und 7 wird die selektive Dosierung in zwei der durch das Polymer 2 gebildeten Mikrokompartiments illustriert. Die Schnittlinie A-A' in der Figur markiert den Bereich, der in den **Fig. 1b** bis **1f** dargestellt ist.

Fig. 1b zeigt im Ausschnitt das Siliziumsubstrat 1 entlang der Schnittlinie A-A' mit zwei Elektroden 2 als Sensorelementen, die von einer über das gesamte Element aufgetragenen Polymerbeschichtung 3 bedeckt ist. Über dieser Polymerschicht ist eine Lochmaske 4 aufgelegt.

Fig. 1c zeigt die Anordnung wie in **Fig. 1b** nach der Entfernung des Polymerfilms 3 an den Stellen der Öffnungen in der Lochmaske mittels Trockenätzverfahren und nachfolgender üblicher Entfernung der photolithographische Maske 4. Die Mikrokompartiments 5 sind als als topfähnliche Vertiefungen über den Sensorelektroden 2 ausgebildet.

Fig. 1d zeigt die Anordnung wie in **Fig. 1c** nach selektive Einbringung bzw. Dosierung der Tropfen 6 und 7 mit gelösten chemischen Spezies A und B.

Fig. 1e zeigt die Anordnung wie in **Fig. 1d** nach chemischer Anbindung der Moleküle A 8 und B 9 bei der Ablösung des Polymerfilms 3 vom Elektrodenarray.

Fig. 1f zeigt den Ausschnitt wie in **Fig. 1e** nach Ablösung des Polymerfilms 2 und stellt das planare Sensorarray ohne mechanische Barrieren dar, das zur analytischen Anwendung mit immobilisierten Molekülarten QA und B benutzt wird.

In **Fig. 2** ist die Ausbildung und Nutzung von Mikrokapillarreaktoren gezeigt. Dazu wird gemäß **Fig. 2a** im Schnitt B-B' nach **Fig. 2e** auf dem Siliziumsubstrat 1 eine vorher strukturierte Polymerschicht 3 befestigt. Die durch Stanz- und Prägetechniken im Polymeren vorgefertigten Mikrokapillarreaktoren bestehen aus den Ein- und Auslaßöffnungen 10 und 11, die durch einen Kanal 13 miteinander verbunden sind.

In **Fig. 2b** ist der Mikrokapillarreaktor mit einer Lösung 7 durch die Einlaßöffnung 11 befüllt, und die Moleküle B 8 wird am Boden des Mikrokapillarreaktors immobilisiert.

Fig. 2c zeigt das mechanische Entfernen der Polymerschicht 3. Es entsteht wie in **Fig. 2d** gezeigt, ein planares Molekülarray wie vorstehend für **Fig. 1f** beschrieben.

Fig. 2e zeigt die Aufsicht auf eine Anordnung von Mikrokapillarreaktoren auf einem Chipsubstrat. Neben den Einlaßöffnungen 11 und den Auslaßöffnungen 12 im Polymer 3 sind dabei die von oben nicht sichtbaren Verbindungskanäle 13 durch schwarze Strichlinien angedeutet. Die Schnittlinie B-B' zeigt den Querschnitt der in **Fig. 2a**, **2b**, und **2c** dargestellt ist. Die Schnittlinie B'-B' zeigt einen mit Flüssigkeit 7 befüllten Mikrokapillarreaktor gemäß **Fig. 2b**.

In **Fig. 3a** ist ein planares Sensorarray mit mikrostrukturierter Oberfläche gezeigt. Auf dem planaren Substrat 1 sind neun Mikroelektrodenanordnungen 2 in einer Polymerschicht 3 mit den Sensorarealen 5, den Kontakten 10 sowie einer mit Flüssigkeit 6 befüllten Position bei A-A' und grabenartigen Vertiefungen 15 dargestellt. Die Querschnitte der **Fig. 3b**, **3c** und **3d** entsprechend der Schnittlinie A-A' in **Fig. 3a**. In **Fig. 3b** ist das planare Substrat 1 und die Mikroelektrodenanordnungen 2 sowie die Polymerschicht 3 mit einer photolithographischen Maske 14 bedeckt. In **Fig. 3c** ist durch Trockenätzen die Mikroelektrodenanordnung 2 im Sensorareal 5 und eine Mikrostruktur mit grabenartigen Vertiefungen 15 freigelegt. Das Sensorareal 5 ist mit einem Tropfen der Flüssigkeit 7 befüllt. **Fig. 3d** stellt einen Ausschnitt eines einsatzbereiten planaren Arrays mit einer Mikrostruktur aus grabenartigen Vertiefungen 15 Polymerschicht in der Polymerschicht 3 und der immobilisierten Moleküle 8 dar.

In Fig. 4 ist die Ausbildung eines Stempels 20 zur Handhabung von Flüssigkeiten auf planaren Arrays 1 mit Mikrokapillarreaktoren gezeigt. In Fig. 4a ist die Aufsicht auf einen Stempel dargestellt, mit dem das Substrat mit den Mikrokapillarreaktoren, wie sie in Fig. 2d dargestellt sind, ganz oder teilweise bedeckt werden können. In der Aufsicht Fig. 4a ist dabei eine Einlaßöffnung 16 und zwei Auslaßöffnungen 17 zu sehen. Die schwarzen Linien markieren die Hohlräume innerhalb des Stempels, die gemäß Fig. 4b Einlaßverteilerkanäle 18 und zwei Auslaßverteilerkanäle 19 darstellen. Die weißen Strichlinien zeigen an, wie die Mikrokapillarreaktoren nach Fig. 2d unter dem Stempel angeordnet sind. Im Querschnitt Fig. 3b ist ein Stempel 20 auf einen Sensorarray 1 mit den Mikrokapillarreaktoren aufgesetzt. Die Einlaßöffnung 16 des Stempels ist über den Einlaßverteilerkanal 18 und den Einlaßöffnungen 11 der Mikrokapillarreaktoren angeordnet. Oberhalb der Auslaßöffnungen 12 der Mikrokapillarreaktoren befinden sich Auslaßverteilerkanäle 19, die alle Auslaßöffnungen 12 mit den Auslaßöffnungen 17 des Stempels verbindet. Bei Applikationen von Flüssigkeiten werden durch die Einlaßöffnungen 16 des Stempels über die Einlaßverteilerkanäle 18 und die Einlaßöffnung 16 die Mikrokompartimente gefüllt. Durch die Verbindungskanäle 13 der Mikrokapillarreaktoren fließt die Flüssigkeit über die Auslaßöffnungen 12 in die Auslaßverteilerkanäle 19 des Stempels zu den Auslaßöffnungen 17 des Stempels an denen die Flüssigkeit wieder entnommen werden kann.

Detaillierte Erfindungsbeschreibung

Das Prinzip der Erfindung besteht darin, daß auf einem planaren Substrat z. B. aus Silizium, Glas, Keramik oder organischen Polymeren oder analogen planaren Elementen, die mit chemischen, optischen oder elektrischen Sensoren bestückt sind, verschiedene Biomoleküle, wie Peptide, Proteine, Oligonukleotide oder Nukleinsäuren auf definierten abgegrenzten Flächen sicher und abgegrenzt immobilisiert werden. Dazu werden auf den vorgesehenen Flächen der Substrate oder Sensorelemente Mikrokompartimente und in einer alternativen Ausführungsvariante Mikrokapillarreaktoren erzeugt, die Lösungen mit unterschiedlichen Molekülen aufnehmen können, ohne daß sie sich miteinander vermischen. Mittels gebräuchlicher chemischer Kopplungsreaktionen, wie z. B. bifunktionelle Reagentien, werden die Moleküle an die Oberflächen der Substrate oder Sensorelemente gebunden, d. h. immobilisiert.

Für die Erzeugung von Mikrokompartimenten in kreisförmiger, quadratischer oder beliebiger anderer Geometrie werden polymere aber auch mineralische oder metallische Werkstoffe benutzt. Im Falle von Polymeren, wie Polysiloxanen, Polyamiden, Polymethacrylaten, Polycarbonaten, Polystyrolen o. a. werden diese auf die planaren Substrate oder die planaren Sensorelemente, die einen kompletten Siliziumwafer oder eine Glasplatte oder auch einen einzelnen Chip darstellen können, aufgebracht und befestigt. Die Haftung der Materialien für die Mikrokompartimente wird entweder durch Eigenhaftung oder durch Heißsiegelverfahren oder durch Laserpunktschweißen oder durch zusätzliche Klebstoffe erreicht. Durch Abstimmung der Eigenschaften von Substrat und Polymer sowie der Befestigungsmethode wird die Möglichkeit der Wiederentfernung erreicht. Dazu werden z. B. Polymere mit entsprechenden Haftungseigenschaften sowie mit ausreichender Resistenz gegen die benutzten Flüssigkeiten ausgewählt. Erfindungsgemäß werden die Polymerfolien, Polymerfilme oder dünnen Polymerplatten vorab mit den vorgegebenen Öffnungen versehen und danach auf Substrat oder Sensorelement befestigt, so

daß die vorgesehenen sensorisch genutzten Flächen frei von Polymer bleiben und ein Mikrokompartiment bilden. Die entsprechenden Öffnungen werden bevorzugt durch Stanzprozesse oder auch fotolithographisch oder mit Lochmasken z. B. in Kombination mit Trockenätzverfahren hergestellt. Dadurch wird das in Fig. 1a dargestellte Element in einem Prozeß erhalten, der zur Massenproduktion geeignet ist.

Diese Methode hat den Vorteil, daß empfindliche Oberflächen und Sensorelemente, wie optische Gitter oder auch Elektroden vom Kontakt mit Fremdstoffen freigehalten werden und man auf diese Weise Kontamination bzw. Verunreinigung der empfindlichen Oberflächen vermeidet.

Analoge Mikrokompartimente können alternativ auch durch Aufkleben von dünnen Silizium-, Glas-, Metall- oder Keramikplatten hergestellt werden. Diese Werkstoffe werden mit Standardprozessen der Mikrosystemtechnik strukturiert und durch wiederablösbare Klebstoffe, wie sie etwa bei Etiketten üblich sind oder auch heißsiegelnde Polymere auf den Substraten oder Sensorelementen befestigt.

Erfindungsgemäß kann in einer anderen Ausführung, wie in Fig. 1a gezeigt das Polymer 3, in dem die Mikrokompartimente erzeugt werden auch in unstrukturierter Form als Ganzes auf dem Substrat oder einem Sensorelement wie vorstehend beschriebenen befestigt werden. Zur Strukturierung dieser Polymerschicht wird danach mittels Fotolack 4 und konventioneller Lithographie oder durch Lochmasken die gewünschten Flächen über den Sensorelementen, die die Mikrokompartimente definieren, freigelegt. Nachfolgend wird z. B. durch Anwendung von Trockenätzverfahren das Material über den Sensorelementen entfernt und es entstehen die Mikrokompartimente.

Als Ergebnis beider Verfahren, sowohl mit vorstrukturierten als auch mit auf den Substraten strukturierten Materialien erhält man dann ein Substrat oder Sensorelement, das Mikrokompartimente in Form von kleinen Töpfchen bzw. Kammern mit Durchmesser bzw. Höhen zwischen ca. 0,2 µm bis mehreren 100 µm aufweist.

Die so hergestellten Substrate oder Sensorelemente mit den Mikrokompartimenten 3 können jetzt wie in Fig. 1c dargestellt mit beliebigen Lösungen befüllt werden. Das Volumen der erzeugten Mikrokompartimente ist dabei den Dosiermitteln wie Mikropipetten, Tintenstrahltechnik oder anderen Dosiertechniken sowie den vorgesehenen chemischen Reaktionen bzw. den gegebenen Sensorfunktionen angepaßt. Die Flüssigkeitsvolumina variieren vorzugsweise zwischen ca. 5–500 pl bei Piezodosieren und ca. 1 nl bis mehrere µl bei Pipettiereinrichtungen. Mit den Dosierflüssigkeiten werden sowohl mit Reagentien zur Immobilisierung als auch verschiedene Biomoleküle in die verschiedenen Mikrokompartimente appliziert.

Die vorgesehenen Oberflächen werden mit kurzkettigen reaktiven bifunktionellen Molekülen aus der Lösung oder aus der Gasphase in Reaktion gebracht. Beispiele für diese Moleküle sind im Prinzip alle Moleküle, die mit dem anorganischen Substrat (Silizium, SiO₂, SiON_x, Glasvarianten) reagieren, also Gruppen wie z. B. Chlor-alkyl- oder -arylsilane, Chloraromaten, Alkoxalkyl-/arylsilane oder Gemische aus diesen Komponenten tragen und die am anderen Ende des Spacermoleküls über eine zweite reaktive chemische Gruppe wie z. B. Aldehyd, Isocyanat, Cyanat, Thiocyanat, Thiolderivat oder Thioester verfügen. Zur Ankopplung beliebiger organischer Moleküle, vor allem Biomoleküle wie RNS- und DNS-Moleküle, Proteine, Peptide und Oligonukleotide werden äquivalente Prinzipverfahren benutzt, wie zur Ankopplung der hydrophoben Moleküle beschrieben. Dabei ist auch sowohl die direkte Kopplung als auch die Spackopplung über die genannten Silan- und Halogengruppen an die Träger- oder Sensoroberflächen mög-

lich.

Als alternative Immobilisierungsvariante kann die self-assembly-Monoschicht-Bildung von Thiolderivaten, z. B. 1-Thiol-n-amino-alkanen, auf Goldoberflächen der Sensoren bzw. benachbarter Hilfsflächen in der Nähe der Transducer angewendet werden. Eine Besonderheit bei der Ankopplung von Biomolekülen in den zuvor beschriebenen Arraystrukturen ist die Möglichkeit, im Batchverfahren alle Kavitäten gleichzeitig so zu aktivieren, daß nachfolgend unterschiedliche Moleküllarten in die einzelnen Kompartiments eingebracht und, wie vorstehend beschrieben, immobilisiert werden.

Dazu kann man wie in Fig. 1e dargestellt, Mikrokompartiments oder Mikrokapillarreaktoren selektieren und darin verschiedene chemische Reaktionen ausführen. Nach ausgeführten chemischen Reaktionen oder nach Immobilisierung einer sogenannten Molekül-Bibliothek kann erfindungsgemäß das Polymer 3 vom Substrat oder dem Sensorelement wieder entfernt werden. Diese kann z. B. mechanisch entsprechend einem Peeling-Prozeß gegebenenfalls auch mit thermischer Unterstützung entfernt werden. Geeignete Polymere können auch durch Ablösen mit Lösungsmitteln, gegen die die immobilisierten Moleküle resistent sind, erreicht werden. Beispielsweise lassen sich Polymethacrylate, Polycarbonate u. a. mit Lösungsmitteln, wie Aceton oder Essigester entfernen und eine Oligonukleotid-Bibliothek bleibt unbeeinflusst gebundenen. Werden empfindliche Moleküllarten, wie Proteine insbesondere Enzyme, Antikörper oder andere immobilisiert, ist das reagenzlose und thermisch nicht belastende, mechanische Entfernen der Mikrokompartiments von besonderem Vorteil.

Die Substrate bzw. Sensorelemente weisen nach der Belegung mit unterschiedlichen Molekülspezies und nach Entfernung der Kompartimente eine ideal planare Oberfläche auf, die den ungehinderten Austausch von Flüssigkeiten, Waschprozesse oder homogene Analysenvorgänge ermöglicht.

In einer speziellen Ausführungsvariante wird als polymeres Material Teflon als Film analog einem Fotolack auf den Siliziumwafer aufgeschleudert und nach Standardmethoden auf den Wafer durch Haftvermittler befestigt. Wie vorstehend beschrieben wird anschließend durch Lochmasken oder Fotolithographie das Teflonmaterial von den vorgesehenen Positionen entfernt und es entstehen Mikrokompartiments entsprechend Fig. 1. Die Höhe dieser Mikrokompartiments beträgt in dieser Ausführungsvariante nur 0,5 bis etwa 10 µm. Wählt man ein Verhältnis von Durchmesser der Kompartiments zur Höhe der Polymerschicht von ca. 10 : 1 oder größer, können die Teflonpolymere auf dem Wafer verbleiben, ohne ein wesentliches mechanisches Hindernis für Spülprozesse oder Analytzugang darzustellen. Der Vorteil der Verwendung dieses Teflons besteht in seinem ausgeprägt hydrophoben Verhalten. Dabei wirken schon die geringen Randhöhen der Mikrokompartiments mit den hydrophoben, d. h. wasserabweisenden Beschichtungen der Zwischenräume sehr gut als Trennelemente zwischen den einzelnen Kompartiments.

In einer anderen Ausführungsform der Erfindung, insbesondere bei sehr kleinen Kompartimentvolumina oder bei Dosierung schlecht benetzender Flüssigkeiten wird anstelle der Mikrokompartiments ein sogenannter Mikrokapillarreaktor hergestellt. Dieser Kapillarreaktor besteht wie in Fig. 2a dargestellt aus 2 Mikrokompartiments 10 und 11 analog wie vorstehend zu Fig. 1 beschrieben, die durch einen kapillarartigen Kanal 12 miteinander verbunden sind.

Bei dieser Ausführungsform werden die Öffnungen und die Kanäle durch Stanzen und Prägen aus polymeren, mineralischem oder metallischem Material oder gegebenenfalls

durch Kombination von Lithographie und Ätzprozessen vorgefertigt und wie im vorstehend Fall der Einzelkompartiments beschrieben auf dem Substrat oder Sensorelement befestigt. Alternativ werden nur die Kanäle vorgefertigt, z. B. durch Prägen oder Ätzen, und die Ein- und Auslaßöffnungen wie vorstehend für Mikrokompartiments beschrieben erzeugt.

Diese Anordnung eines Mikrokapillarreaktors wirkt wie ein System kommunizierender Röhren. Durch die geringen Abmessungen von Kompartiment und Kanal in Dimensionen von 1 µm bis ca. 1 mm, vorzugsweise 50–500 µm, wirken Kapillarkräfte beim Befüllen mit Flüssigkeiten.

Wird in eines der Kompartiments, das auch unterschiedlich groß als das andere ausgebildet sein kann, eine Flüssigkeit appliziert, füllt sich durch die Kapillarkraft auch das zweite Kompartiment über den Kanal spontan ohne zusätzliche Hilfsmittel. Ein weiterer Vorteil ist es, daß die applizierte Flüssigkeit vorhandenes Gas in den Mikrokompartiments und dem Kanal durch die zweite Öffnung verdrängt und damit zuverlässig den Verbleib von Gasbläschen verhindert. Erfindungsgemäß können in diese Mikrokapillarreaktoren auch Tropfen dosiert werden, die größer sind als die Öffnung eines der Kompartiments, weil durch die Kapillarkräfte ein solcher Tropfen spontan eingesaugt wird. Die Anordnung des Kapillarreaktors ermöglicht weiterhin auch die direkte Befüllung aus einer auf eine der Kompartimentöffnungen aufgesetzten Kapillare. Nach dem Aufsetzen einer solchen mit Flüssigkeit gefüllten Kapillare saugt sich das System spontan mit Flüssigkeit voll, ohne daß ein Auslaufen beobachtet wird. Neben den besonders einfachen Pipettiermethoden sind auch Piezo- oder andere Tintenstrahldosiertechniken zur Befüllung anwendbar. Das System des Kapillarreaktors kann erfindungsgemäß auch für die Zuführung gleicher Flüssigkeiten oder effiziente Flüssigkeitswechsel, wie sie häufig bei chemischen Reaktionen oder Immobilisierungsverfahren notwendig sind, benutzt werden. Im einfachsten Fall wird ein solcher Waschvorgang durch das Aufsetzen einer Kapillare zum Dosieren an oder auf eine Kompartimentöffnung und dem Absaugen mit einer zweiten Kapillare aus der zweiten Kompartimentöffnung realisiert.

In einer weiteren Ausführungsform wird photostrukturierbares Polyimid nach Standardprozeduren als Material für Mikrokompartiments und zusätzlichen grabenartigen Strukturen verwendet. Wie oben beschrieben werden 50–200 µm hohe Mikrokompartiments photolithografisch oder durch Trockenätzen erzeugt. Zusätzlich werden bei dieser Ausführungsform die Sensorareale von ringförmigen grabenartigen Strukturen in Dimensionen zwischen 10 und 100 µm Breite umgeben (Fig. 3). Wahlweise können wenige breitere oder viele entsprechend schmale Strukturen angeordnet werden. Der hydrophobe Charakter des Polyimids bewirkt, ebenso wie für die Beschichtung mit Teflon aufgezeigt, eine abweisende Eigenschaft für wässrige Lösungen. Bei der Dosierung von Tropfen in die Sensorareale wird die Gefahr des Übertretens in eine benachbarte Kavität durch die grabenartigen Strukturen, die flüssiges Material aufnehmen können, entscheidend vermindert. Gegenüber einem flächigen Zwischenraum zwischen den Kompartiments wirken hier drei trennende Effekte, erstens die hydrophobe Eigenschaft des Polyimids, das Volumen der grabenartigen Strukturen, die Flüssigkeit aufnehmen können, und die Kanteneigenschaften der Mikrostrukturen die Tropfen wie an der Kante einer planen Fläche am Abfließen hindern.

Zum Dosieren und auch Absaugen der verwendeten Lösungen werden Kapillaren derart ausgezogen, daß der Außendurchmesser an ihrer Spitze ca. 2–10 µm beträgt. Die Kapillarenspitzen sind damit im Verhältnis zu den einzelnen Arraypositionen relativ klein. Die mit diesen Kapillaren ge-

trennt abgebbaren Volumina sind im unteren nl-Bereich damit in Relation zum Gesamtvolumen in einem Mikrokompartiment oder in einem Mikrokapillarreaktor ebenfalls sehr klein, da sie ca. 5–10% dieses Gesamtvolumens betragen. Alternativ werden mit Piezo-Dosierköpfen pl-Mengen der entsprechenden Lösungen berührungslös in Mikrokompartiments oder in einen Mikrokapillarreaktor eingebracht. Hierbei ist die Dimension des auftretenden pl-Tropfenstrahls in Relation zur Dimension des Arrayposition noch geringer.

Für das Dosieren verschiedener Lösungsmittel mit den Glaskapillaren wurde die Polarität der Außenseite der Glaskapillaren durch chemische Modifikation entgegen der Polarität des jeweils verwendeten Lösungsmittels eingestellt. So können nach Hydrophobisierung der Außenseite der Kapillaren mit Chlorsilan wässrige Lösungen definiert und verlustfrei dosiert werden, da eine retrograde Wanderung von aus der Kapillarenspitze ausgetretenen Tropfen nicht mehr erfolgt. Für die Dosierung organischer Lösungsmittel wird die umgekehrte Lösung verwendet. Mit hydrophiler Außenseite der Kapillarenspitze ist retrogrades Wandern der ausgetretenen Tropfen nicht mehr möglich.

Die Verdunstung von wässrigen Lösungen kann im Falle planarer Strukturen und Mikrokompartiments wirksam durch Lagerung unter gesättigter Wasserdampf Atmosphäre verhindert werden. Es besteht zudem die Möglichkeit, Volumenverlust durch Verdunstung mittels aufgelegten oder aufgeklebten Folien zu verhindern. Ohne diese Maßnahmen erfolgt bei planaren Strukturen innerhalb 0,5 min und bei Mikrokompartiments innerhalb weniger Minuten das Abtrocknen der aufgetragenen Flüssigkeiten.

Das Füllen und Absaugen kann ebenso durch das Aufsetzen eines komplementären Stempels 20 entsprechend Fig. 3 vorgenommen werden. Durch den Stempel werden wie in Fig. 4 dargestellt mehrere oder alle Einlaßöffnungen 11 der Mikrokapillarreaktoren durch einen Verteilerkanal 18 im Stempel 20 miteinander verbunden. In gleicher Weise werden die verschiedenen Ausflußöffnungen 12 der Kapillarreaktoren im Array durch die Verteilerkanäle 19 miteinander verbunden. Dies kann reihenweise oder für das gesamte Array realisiert werden, so daß mit Einlaß- und Auslaßöffnung 16 bzw. 17 das gesamte Mikrokapillareaktorarray unter Druck gespült oder beschickt werden kann. Dazu wird Flüssigkeit mit Schläuchen aus entsprechenden Reservoirs oder Befüllungsapparaturen in die Einlaßöffnung 16 zugeführt und durch die Auslaßöffnungen 17 im Stempel durch das zweite Kanalsystem wieder abgeführt. Solche Stempel können bevorzugt aus dichtenden Polymeren oder gummiartigen Materialien wie z. B. Silikon, Polyamiden oder Polykohlenwasserstoffen hergestellt werden. Es sind aber auch Metall- oder Siliziumstempel mit dünnen elastischen Dichtungen geeignet. Im Falle von Glas- oder Siliziummaterialien können besonders vorteilhaft die üblichen Ätzverfahren zum Herstellen von Mikrostrukturen verwendet werden.

Nach Reaktionen in den Arrays und/oder Immobilisation von Molekülen auf den Bodenflächen der Kompartiments, die sich auf den Substraten oder Sensorelementen befinden, kann ebenso wie für die einfachen Mikrokompartimentarrays beschrieben die Materialschicht, die den Mikrokapillarreaktor bildet, entfernt werden. Erfindungsgemäß wird auf diese Weise ein planares Molekülarray ohne mechanische Hindernisse zwischen Einzelpositionen erzeugt.

Beispiel 1

Herstellung eines elektrischen Sensorarrays

Mikroelektrodenstrukturen entsprechend Fig. 1 werden in Standard-silizium-technologie hergestellt. [K. Reimer et al., Sensors and actuators, A 46/47(1995)66]. Dazu wird 500 nm dickes thermisches Oxid auf 4"-Siliziumwafern erzeugt. Auf dem Oxid wird Lack photolithografisch so strukturiert, daß die Konturen der Elektroden für die Elektrodenstrukturen freiliegen. Das Elektrodenystem gemäß Details in Fig. 1a besteht aus kammartigen Elektrodenbändern mit 1,5 µm Breite im Abstand von 800 nm. Die Elektrodenbänder sind über Leiterbahnen (nicht sichtbar) unter der Isolierung 3 mit den Kontaktflächen 10 verbunden. Es sind 12 Sensorarraypositionen in einer 4 × 4 Matrix mit Arraypositionen von 300 µm Durchmesser auf dem Sensorarray angeordnet. Die Abstände der Sensorarraypositionen betragen 400 µm, so daß ein aktives Sensorarraygebiet von ca. 2,5 mm × 2,5 mm entsteht.

Der mit Siliziumdioxid beschichtete Wafer wird mit einer photolithographischen Maske mit den Strukturen der Elektroden versehen. Eine 20 nm dicke Titanhaftschrift und eine 150 nm dicke Goldschicht werden auf die gesamte Oberfläche mittels Elektronenstrahl aufgedampft. Durch einen Lift off-Prozeß wird alles Material zwischen den Elektroden, Leiterbahnen und Kontakten beseitigt. Der Wafer wird anschließend mit einer 400 nm dicken Silizium-oxinitridschicht bedeckt, die im Plasma durch chemische Abscheidung (PECVD-SiN_x:H) erzeugt wird. Im folgenden werden die Arraypositionen und die außenliegenden Kontaktflächen durch reaktives chemisches Trockenätzen bis auf die Goldflächen freigelegt. Nach Aufschleudern eines Schutzlackes wird der Wafer von der Rückseite entsprechend der vorgesehenen Einzelchipkanten ca. 250 µm tief von der Rückseite eingesägt.

Beispiel 2

Aufbau von Mikrokompartiments mit vorgefertigten Polymeren durch Heißsiegeln

Elektrische Sensorarrays, die nach Beispiel 1 hergestellt worden sind, werden mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen. Im folgenden Schritt werden sie im Waferverbund durch das Auflaminieren einer vorher perforierten 400 µm dicken Polypropylen-Folie mit Mikrokompartiments belegt. Die Perforation entspricht dabei den Größen der Sensorarraypositionen und der Kontaktflächen. Das Auflaminieren geschieht mittels Erwärmung durch einen Stempel. Es werden ca. breite Streifen 200 µm um die Arraypositionen herum versiegelt. Die Justage der mittels eines Vakuumstempels in Wafergröße aufgetragenen Folie wird mittels Justiermarken auf der Waferoberfläche durch optische Kontrolle vorgenommen. Der auf -20°C gekühlte Wafer wird entlang der gemäß Beispiel 1 vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 3

Aufbau von Mikrokompartiments mit vorgefertigten Polymeren durch Laminieren

Optische Sensorarrays, die aus Glaswafern bestehen, die

homogen mit einer lichtleitenden Schicht aus Siliziumoxinitrid sowie einer Siliziumdioxidschicht von ca. 20 nm versehen sind, werden gemäß Beispiel 1 von der Rückseite angesägt. Anschließend werden sie mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen.

Im folgenden Schritt wird ganzflächig eine 0,3 mm Polypropylenfolie mittels rückstandsfrei ablösbaren Klebers befestigt. Nach dem Auflegen einer 0,6 mm starken Lochmaske aus geätztem Silizium wird mit einer Lochanordnung die den gewünschten Arraypositionen und Mikrokompartiments entspricht, mittels reaktivem Trockenätzen das polymere Material entsprechend den Arraypositionen bis zur Siliziumdioxidschicht weggeätzt. Dazu benutzt man reaktives Plasma. Der auf -20°C gekühlte Wafer wird entlang der gemäß Beispiel 1 vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 4

Aufbau von Mikrokapillarreaktoren

Elektrische Sensorarrays, die nach Beispiel 1 hergestellt worden sind, werden mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen. Im folgenden Schritt werden sie durch Kleben analog Beispiel 3 mit einer vorher perforierten 0,5 mm dicken Polyamidscheibe im Waferformat versehen. Zur Erzeugung der Mikrokapillarreaktoren werden vorher in die Polymerscheibe die 100 µm langen Verbindungskanäle eingepreßt. Die Ein- und Auslaßöffnungen werden wie die Mikrokompartiments in Beispiel 3 hergestellt. Die Einlaßöffnungen haben 200 µm und die Auslaßöffnungen 300 µm Durchmesser. Der auf 20°C gekühlte Wafer wird entlang der gemäß Beispiel 1 vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 5

Aufbau von Mikrokompartiments mit photolithographisch strukturierten Polymeren

Elektrische Sensorarrays im Waferverband nach Beispiel 1 werden mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen. Anschließend werden sie im Spin coat-Verfahren mit Teflon AF (DuPont) mit einem 15 µm dicken Film beschichtet. Zuvor wird der gesamte Wafer mit dem zugehörigen Haftmittel (DuPont) benetzt. Nach Ausbacken der Teflonschicht bei 150°C für 20 Minuten wird eine photolithographische Maske mit den Strukturen der Arraypositionen sowie der grabenartigen Vertiefungen gemäß 15 in Fig. 3a und der Kontaktflächen aufgebracht. Das Teflon wird mittels reaktivem Trockenätzen von den Gebieten der Arraypositionen und der Kontaktflächen sowie der grabenartigen Strukturen bis zu den Oberflächen der Elektroden bzw. der Substratoberfläche freigelegt.

Alternativ zu Teflon AF kann die Polymerschicht auch aus Standard-Polyimid hergestellt und identisch strukturiert. Der Wafer wird entlang der gemäß Beispiel 1 vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 6

Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Sensorarrays

Ein nach Beispiel 3 hergestellter Chip wird auf einen Ke-

ramikträger mit üblichen Leiterbahnen montiert und drahtgebondet. Durch Aufkleben eines polymeren Formteils aus Polysiloxan entlang der Chipkanten, das die aktiven Elektrodengebiete eingrenzt, wird ein Reaktionsgefäß von ca. 5 mm Durchmesser auf dem Chip befestigt. In dieses Reaktionsgefäß wird eine 5 mm Lösung von 11-Merkapto-undecan-yl-amin in Cyclohexanon, eingefüllt, abgedeckt und bei Raumtemperatur für 5 Stunden belassen. Die Belegung der Elektroden durch Self-assembly wird kontrolliert durch eine online-Impedanz-Messung (EG&G Model 398).

Diese Belegung der Metalloberflächen kann alternativ auch vor dem Brechen und Vereinzeln der Chips durch Tauchen des gesamten vorher entlackten Wafers in die analogen Lösungen vorgenommen werden.

Die nun mit Aminofunktionen derivatisierte Oberfläche des Chips wird anschließend mit einem Tropfen (0,1–10 µl) 20 mM Tolylen-2,4-diisocyanat (TDI) in Essigsäureethylester (EEE) bei Raumtemperatur während 10–60 min inkubiert. Es wird mit EEE gewaschen und getrocknet.

Nach Waschen eines so aktivierten Chips mit neutraler Phosphatpufferlösung werden mittels Mikrokapillardosierung nacheinander in jede Sensorarrayposition je 5 nl 24mer-Oligonukleotid eingebracht, die am 5'-Terminus eine Jodoacetyl-Gruppe tragen.

Die Nucleotidsequenz ist an jeder Arrayposition unterschiedlich entsprechend der zu analysierenden verschiedenen Ziel-DNA-Moleküle. Dabei entsprechen die Reaktionsflüssigkeiten den Volumina der Mikrokompartiments. Die Kopplungsreaktion erfolgt spontan während einer Stunde bei Zimmertemperatur. Nach erfolgter kovalenter Anbindung wird das elektrische Sensorarray mit SSPE-Puffer (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂EDTA, pH 7,5) gewaschen.

Die vorstehend genannten strukturierten Polymerbeschichtungen werden durch mechanisches Peeling von den Chips entfernt.

Beispiel 7

Immobilisierung von Antigen-Proteinen auf Sensorarrays

Ein nach Beispiel 5 hergestellter Chip wird auf einen Ke-

ramikträger mit üblichen Leiterbahnen montiert und drahtgebondet. Durch Aufkleben eines polymeren Formteils aus Polysiloxan entlang der Chipkanten, das die aktiven Elektrodengebiete eingrenzt, wird ein Reaktionsgefäß von ca. 5 mm Durchmesser auf dem Chip befestigt. Die in diesem Ring liegenden Flächen werden mit Alkohol und destilliertem Wasser gewaschen.

Direkt danach erfolgt eine Silanisierung der Oberflächen in den Arraypositionen durch Inkubation in Toluol unter Zugabe eines Silans (z. B. Aminopropyltriethoxysilan; Isocyanatopropyltriethoxysilan; Glycidoxypropyltrimethoxysilan) ad 1–5% (v/v) bei 40–80°C während 1–30 h. Nach mehrfachem Waschen in Toluol wird im Trockenofen während 0,5–2 h bei 60–80°C getempert. Die derartig mit sekundären chemischen Funktionen derivatisierten Oberflächen werden anschließend direkt mit einem Tropfen (0,1–10 µl) 20 mM Tolylen-2,4-diisocyanat (TDI) in Essigsäureethylester (EEE) bei RT während 10–60 min inkubiert. Nach Waschen mit EEE wurde nach Trocknen in jedes Mikrokompartiment ein Tropfen (0,1–10 µl) einer anderen Antigen-Proteinlösung (c_{Protein} ca. 1–10 mg/ml in Carbonatpuffer oder Phosphatpuffer pH 9,5) aufgegeben und bei RT während 0,1–2 h inkubiert.

Die vorstehend genannten strukturierten Polymerbeschichtungen werden durch mechanisches Peeling von den

Chips entfernt.

Beispiel 8

Anwendung eines Stempels zur Affinitätsbindung von DNA auf Sensorarrays 5

Elektrische Sensorarrays werden nach Beispiel 1 hergestellt, wobei die Aktuatoren als interdigitale Elektroden gestaltet sind [M. Paeschke et al., *Analytica Chimica Acta* 305(1995)126]. Nach Beispiel 4 werden sie mit Mikrokapillarreaktoren versehen und nach Beispiel 6 mit verschiedenen Oligonucleotiden belegt.

Ein Stempel entsprechend Fig. 4 wird unter mechanischem Druck auf dem Array befestigt. Anschließend wird DNA-Analyt als Gemisch durch den Stempleingang 16 in die Mikrokapillarreaktoren eingefüllt. Es wird Analyt-DNA verwendet, in welche bei der konventionellen Vervielfältigung der DNA mittels PCR biotinylierte Primer Biotin-Reste eingeführt wurden. Die Analyt-DNA in SSPE-Puffer wird mit Denhardt's Lösung (0,5 g Ficoll, 0,5 g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g RSA in 0,51 H₂O) in eine Konzentration von 1 µg/ml überführt und auf das Sensorarray aufgegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6 g NaCl, 26,5 g Na-Citrat in 0,81 H₂O) gewaschen, indem die Spülflüssigkeit unter Druck durch Stempel und Reaktoren gespült und an den Ausgangsöffnungen 17 entnommen wird.

Die Detektion gebundener DNA erfolgt nach Markierung mit Streptavidin/alkalische Phosphatase-Konjugaten und erneutem Waschen durch elektrochemisches Redox-Recycling [Hintsche et al., in *Frontiers in Biosensors/Fundamental Aspects*, eds. F. W. Scheller et al., Birkhäuser Verlag Basel/Schweiz 1997, p 278] an jeder Arrayposition. 35

Bedeutung der Numerierung

- | | |
|--|----|
| 1 Substrat | |
| 2 Dünnfilmelektrode | 40 |
| 3 Polymerschicht | |
| 4 Lochmaske | |
| 5 Mikrokompartment | |
| 6 Flüssigkeitstropfen mit Molekülart A | |
| 7 Flüssigkeitstropfen mit Molekülart B | 45 |
| 8 Immobilisierte Molekülart A | |
| 9 Immobilisierte Molekülart B | |
| 10 Chipkontakt | |
| 11 Kapillarreaktor-Einlaß | |
| 12 Kapillarreaktor-Auslaß | 50 |
| 13 Kapillarreaktor-Kanal | |
| 14 Photolithographische Maske | |
| 15 grabenartige Mikrostruktur | |
| 16 Stempleinlassöffnung | |
| 17 Stempleauslassöffnung | 55 |
| 18 Stempleinlassverteilerkanal | |
| 19 Stempleauslassverteilerkanal | |
| 20 Stempel aus Polymer | |

Patentansprüche 60

1. Verfahren zur Herstellung eines molekularen Arrays auf dem Moleküle mittels Mikrokompartmenten oder Mikrokapillarreaktoren auf planaren Substraten oder Sensorelementen immobilisiert werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß molekulare Arrays mit planaren Oberflächen erzeugt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-

zeichnet, daß temporäre Mikrokompartmenten in zusätzlich aufgebrachtten Schichten und Öffnungen mit Zugang zur Oberfläche auf planaren Substraten oder Sensorelementen erzeugt werden.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß temporäre Mikrokompartmenten durch zusätzlich aufgebrachte perforierte Schichten mit Öffnungen und Zugang zur Oberfläche auf planaren Substraten oder Sensorelementen erzeugt werden.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils 2 Mikrokompartmenten durch einen Kanal miteinander zu einem Mikrokapillarreaktor verbunden werden, wobei dessen Boden von der Oberfläche der planaren Substrate oder Sensorelemente gebildet wird.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokompartmenten oder die Mikrokapillarreaktoren aus polymeren, oder metallischen oder mineralischen Materialien bestehen.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die planaren Substrate oder Sensorelemente aus polymeren, oder metallischen oder mineralischen Materialien bestehen.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorelemente vielfach angeordnete optische oder elektrische Transducer sind.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur temporären Ausbildung der Mikrokompartmenten oder Mikrokapillarreaktoren die Materialien wiederablösbar mit dem Substrat oder verbunden werden.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß in den Schichten für die Erzeugung der Mikrokapillarreaktoren oder Mikrokompartmenten vorab Perforationen oder geprägte Strukturen erzeugt worden sind, die den Mikrokompartmenten oder Mikrokapillarreaktoren entsprechen bzw. durch zusätzliche Schritte aus vorgefertigten Teilstrukturen in diese umgeformt werden können.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokompartmenten oder Mikrokapillarreaktoren durch photolithographische Prozesse in Kombination mit Naßätzverfahren oder reaktiven Trockenätzen an den gewünschten Stellen durch Schaffung der entsprechenden Volumina der Mikrokompartmenten oder Mikrokapillarreaktoren erzeugt werden.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Fläche in Mikrokompartmenten oder Mikrokapillarreaktoren, die an die Substrate oder Sensorelemente grenzen, für chemische Reaktoren frei zugänglich sind.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialien der Mikrokompartmenten oder Mikrokapillarreaktoren physikalisch oder chemisch entfernt werden.

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein den Maßen der Mikrokapillarreaktoren angepaßter Stempel, der mit fluidischen Kanälen ausgerüstet ist, durch Aufsetzen auf die Mikrokapillarreaktoren zur paarweisen, reihenweisen oder gesamten Behandlung mit Flüssigkeiten benutzt werden kann.

14. Molekularer Array erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

15. Verwendung eines molekularen Arrays nach An-

spruch 14 zur Affinitätsbindung von DNA.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

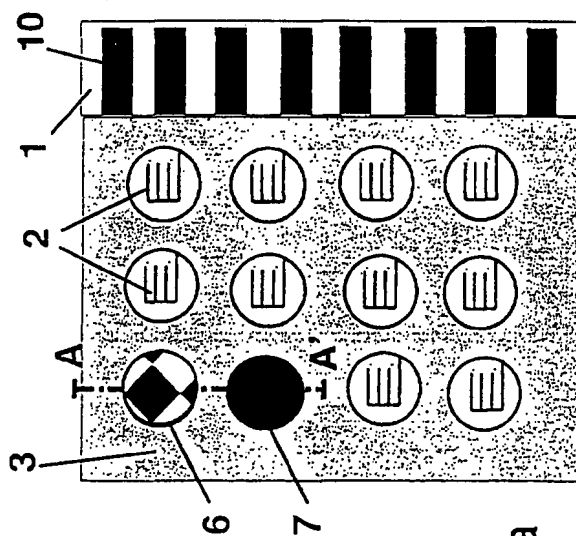


Fig. 1a

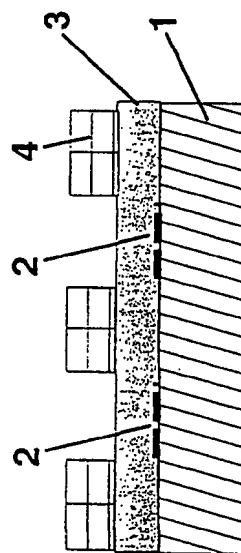


Fig. 1b

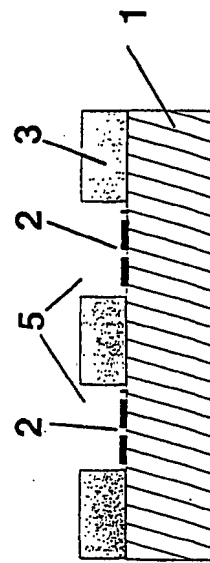


Fig. 1c

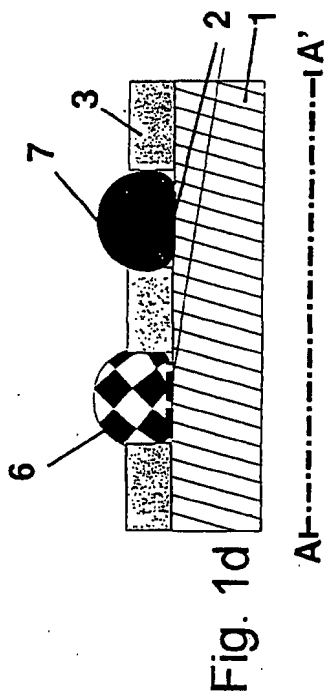


Fig. 1d

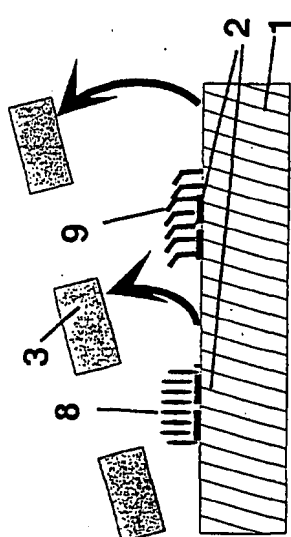


Fig. 1e

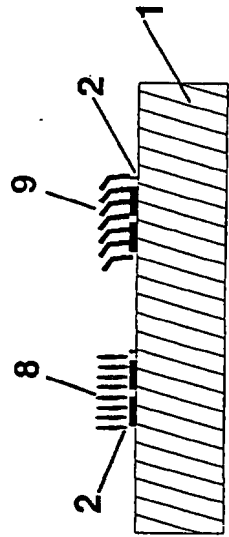


Fig. 1f

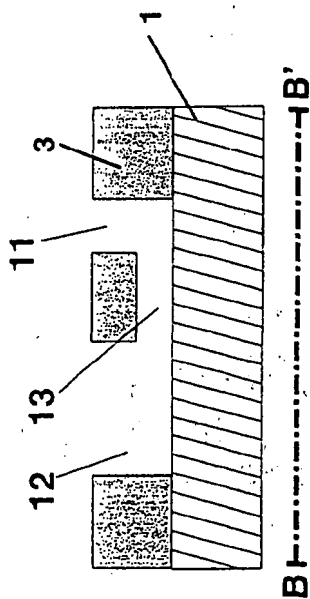


Fig. 2a

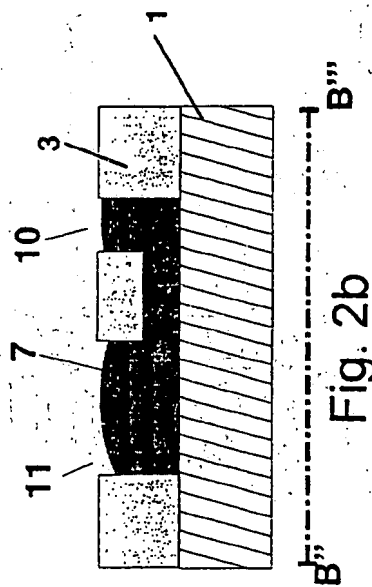


Fig. 2b

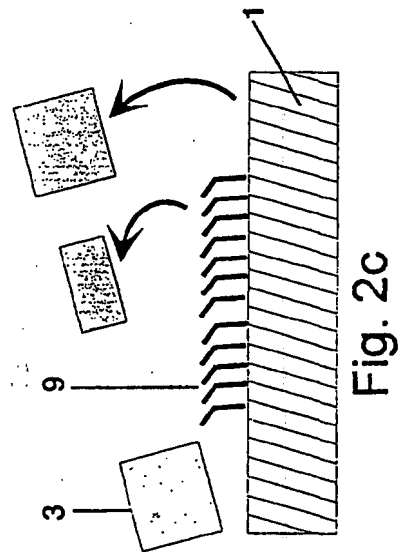


Fig. 2c

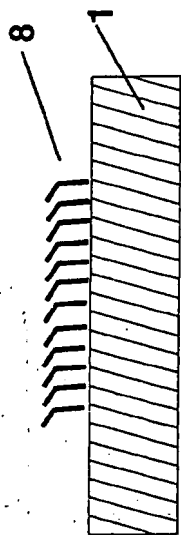


Fig. 2d

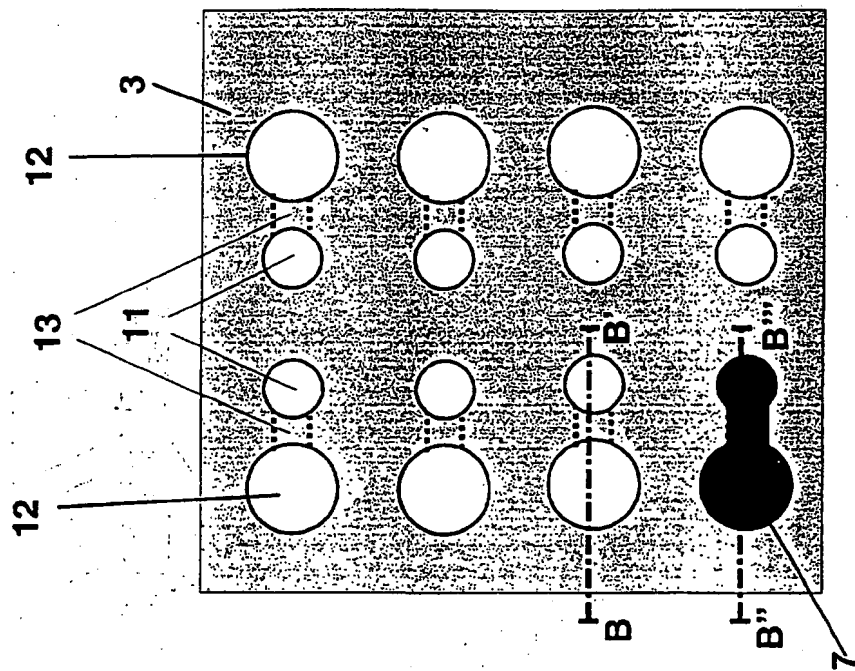


Fig. 2e

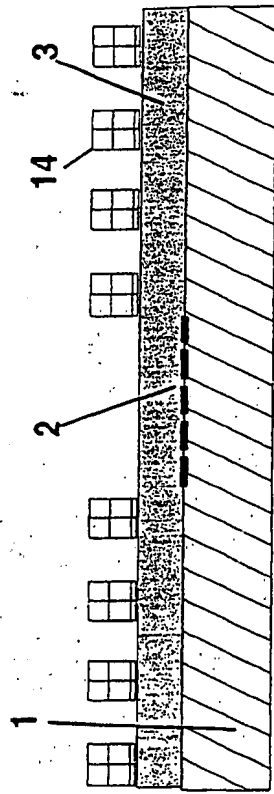


Fig. 3b

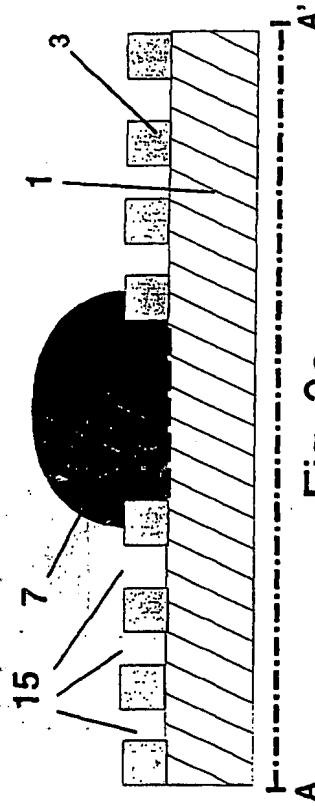


Fig. 3c

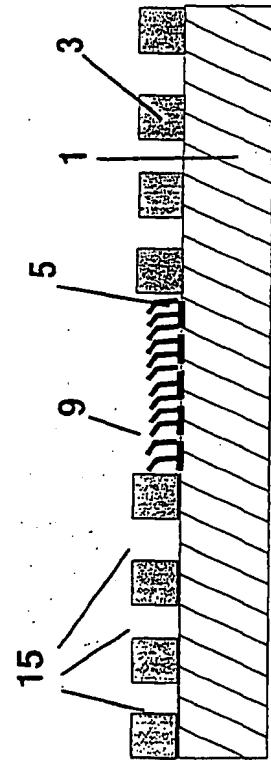


Fig. 3d

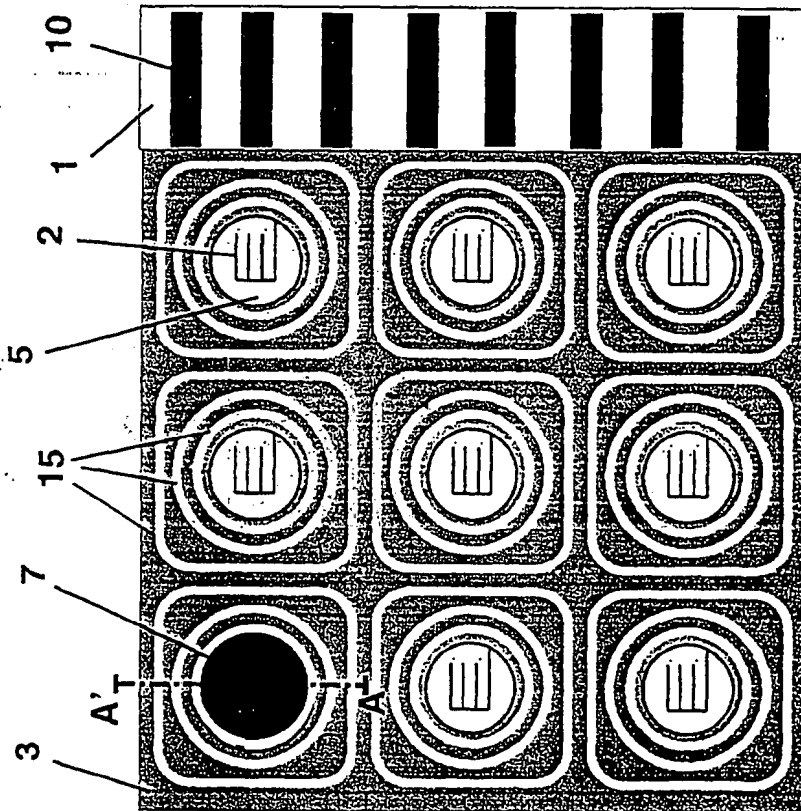


Fig. 3a

